Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel

Kritik der Methoden der Harnsäurebestimmung in Blut und Organen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Hans Pinösch
Ardez (Graubünden)

BASEL 1937
Druck von Benno Schwabe & Co.

Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel

Kritik der Methoden der Harnsäurebestimmung in Blut und Organen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Hans Pinösch
Ardez (Graubünden)

BASEL 1937
Druck von Benno Schwabe & Co.

Von der medizinischen Fakultät der Universität Basel
genehmigt auf Antrag von Prof. *S. Edlbacher*
Tag der Promotion: 19. Dezember 1936

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus der Schweizerischen Medizinischen Wochenschrift, 1937, Nr. 30, Seite 694.

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546701_0054

In den letzten Jahren wurden über den Stoffwechsel der Harnsäure verschiedene neue Tatsachen bekannt, welche die *Wiener-sche* Theorie der Harnsäuresynthese im Organismus der Sauropsiden fraglich erscheinen lassen (1). Da wegen ihrer interessanten neuen Aufschlüsse über den Zusammenhang von Harnstoff- und Harnsäurestoffwechsel eine genaue Prüfung wünschenswert erschien, befaßte ich mich vorerst auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. *Edlbacher*[1]) mit der Technik der Harnsäurebestimmung in Gewebeextrakten. Die vorliegende Arbeit behandelt ausschließlich die technische Seite des Problems.

Eine neue Ueberprüfung der Genauigkeit der gebräuchlichen Harnsäure-Bestimmungsmethoden erschien uns nicht überflüssig, da aus den Resultaten von Harnsäurebestimmungen im Blute und in Organ-Extrakten weitgehende Schlüsse in Bezug auf den Stoffwechsel dieses Purin-Abbauproduktes, und damit der Purine überhaupt, gezogen werden. Auch vom klinischen Standpunkte aus ist ja die Frage wegen des Zusammenhangs mit Arthritis urica von großer Wichtigkeit.

1912 veröffentlichten *Folin* und *Denis* (2) ihre erste quantitative kolorimetrische Harnsäure-Bestimmungsmethode. Sie bestimmten die Harnsäure auf Grund ihrer reduzierenden Wirkung auf Phosphorwolframsäure zu einem blauen Farbstoff, wobei die Harnsäure wahrscheinlich quantitativ zu Allantoin oxydiert wird. Diese Methode, oder eine ihrer zahlreichen Varianten, wurde seither sowohl für klinische als auch für physiologisch-chemische Arbeiten sozusagen ausschließlich angewandt, was wegen der relativen Einfachheit und Raschheit der Ausführung begreiflich ist. Aber schon *Folin* gibt zu, daß die Reaktion, die zur Blaufärbung führt, für Harnsäure keineswegs spezifisch sei, sondern auch durch zahlreiche andere Verbindungen, vor allem Phenolderivate, hervorgerufen werden

---

[1]) Ich gestatte mir an dieser Stelle Herrn Professor *S. Edlbacher* meinen herzlichsten Dank für die Förderung meiner Arbeit auszusprechen.

könne. Jedoch hielt er die Vorteile der Methode und ihre Genauigkeit bei der Anwendung auf Harn und Blut für so groß, daß er sie doch als absolut zuverlässig erklärte.

Benedict (3) glaubte die Spezifität der Reaktion dadurch zu erhöhen, daß er Arsenophosphorwolframsäure als Reagens und Natriumzyanid statt Soda zur Alkalisierung verwendete. Durch diese Variation gab er die erste *direkte* Bestimmungsmethode an, während *Folin* die Harnsäure aus dem Serumfiltrat gefällt hatte, um sie von anderen, im Serum möglicherweise vorhandenen reduzierenden Substanzen zu trennen und in reiner Lösung zu bestimmen. Beide Autoren gaben noch verschiedene Abänderungen ihrer Methoden bekannt, und soviel aus der Literatur ersichtlich ist, sind es die Methoden von *Folin* und *Denis* (1922) (4), von *Benedict* (1922) (5), von *Folin-Trimble* in der Variation von *Neubauer* (6), die am häufigsten Verwendung finden.

Nun haben schon 1922 *K. Harpuder* und *R. Mond* (7) auf die Ungenauigkeit sämtlicher kolorimetrischer Harnsäure-Bestimmungsmethoden hingewiesen und manche Fehlerquellen deutlich hervorgehoben. Die letzten Verbesserungen sowohl der *Folinschen* als auch der *Benedictschen* Methoden sind allerdings erst nachher publiziert worden. Ebenfalls 1922 beschäftigten sich *H. Steudel* und *K. Suzuki* (8) eingehend mit der Bestimmung der Harnsäure in Gewebsauszügen, wobei sie zum Schlusse kamen, daß „die ausgezeichnete Methode *Folins*, die so schöne Resultate bei der Untersuchung des Harns und des Blutes gibt, nicht ohne weiteres auf andere Flüssigkeiten übertragen werden darf."

St. J. von Prcylecki und Mitarbeiter (9) haben über die Bindung von Harnsäure an Eiweißkörper eingehende Studien gemacht, deren Resultate für die Harnsäurebestimmung von Interesse sind. 1928 erschien eine Arbeit von *Schreiner* (10), welche die Brauchbarkeit der in Frage kommenden Methoden als sehr zweifelhaft erscheinen läßt. *Schreiner* wies nach, daß zahlreiche im Serum und in Gewebsextrakten vorkommende Substanzen eine intensive Blaufärbung mit Harnsäurereagens geben, so z. B. zweiwertige Eisenverbindungen, ungesättigte Fettsäuren, Tyrosin, Adrenalin, die aromatischen Amine, Hämoglobin. Zahlreiche andere Autoren, um nur einige zu nennen: *Georg Landmann* (1914) (11), *Blankenstein* (12) und *W. Schuler* (1932) (1) erklären sich von den von ihnen angewandten kolorimetrischen Harnsäure-Bestimmungsmethoden durchaus befriedigt. Tatsächlich sind sämtliche uns zugängliche Arbeiten über Harnsäure-Stoffwechsel mit diesen Methoden durchgeführt worden. Dies scheint uns nur erklärlich, weil diese Methoden so verführerisch einfach sind und bis in letzter Zeit nichts Besseres vorhanden war. Noch einfacher ist allerdings die von *Flatow* (13) angegebene titrimetrische Methode, die auch auf der Oxydation der Harnsäure zu Allantoin beruht. Neuerdings ist von *Edson* und *Krebs* (1936) (14) eine Methode angegeben worden, die aus später zu erörternden Gründen größte Beachtung verdient.

Es steht fest, daß die Genauigkeit der üblichen Methoden meist überschätzt worden ist, und daher sind vielleicht manche Schlußfolgerungen aus so erhaltenen Resultaten nicht ganz stichhaltig. Ich habe die neueren Methoden einer eingehenden Prüfung unterzogen, um wenn möglich feststellen zu können, ob auf diesem Wege der Harnsäuregehalt der verschiedenen Organe bestimmt werden kann oder wenigstens sich schätzen läßt.

Methodik

Meine Untersuchungen erstreckten sich auf die indirekte (15) und die direkte (4) Bestimmungsmethode von *Folin*, diejenige von *Benedict* und *Hitschcock* (3), *Folin-Trimble*, modifiziert von *Neubauer* (6), die titrimetrische Methode von *Flatow* (13) und die manometrische von *Edson* und *Krebs* (14). Ich hielt mich im allgemeinen genau an die Angaben der betreffenden Autoren, bei der Fällungsmethode von *Folin* arbeitete ich meist unter absolutem Lichtschutz, bei der *Neubauerschen* Methode mußte nicht nach, sondern innert 8 Minuten kolorimetriert werden.

Ich versuchte bei jeder Methode, ausgehend von der entsprechenden Standardlösung, eine Eichkurve für das Stufenphotometer zu erhalten. Dabei zeigte sich sogleich eine Schwierigkeit. Die Methoden von *Folin* und *Benedict* sind so empfindlich, daß Blindwerte nicht zu vermeiden sind. Infolgedessen ist die Farbintensität nicht streng proportional der Harnsäurekonzentration. Aber auch bei der etwa zehnmal weniger empfindlichen Methode von *Neubauer* besteht nur in engen Grenzen Proportionalität. Der sich hieraus ergebende Fehler ist jedoch bei Auswahl der günstigsten Konzentration relativ klein und könnte vernachlässigt werden. Viel unangenehmer wirkt sich aus, daß unsere Natriumcyanidlösung (auch die über drei Wochen alte und die mit Tierkohle gekochte) sehr wechselnde Blaufärbung verursachte, sodaß sich die Erstellung einer Eichkurve von allgemeinerer Gültigkeit als unmöglich erwies. Aus unbekanntem Grund waren auch die Standardwerte der *Neubauerschen* Methode variabel. Im günstigsten Meßbereich der *Folinschen* Methode, bei 0,01—0,02 mg Harnsäure in 25 ccm, konnten Abstufungen von 0,004 mg mit Sicherheit unterschieden werden (dies gilt nur von jeder einzelnen Serie, während nach oben Gesagtem die verschiedenen Serien keine absolut vergleichbaren Werte ergaben). Aehnlich verhält es sich bei der *Benedictschen* Methode. Bei der *Neubauerschen* Methode sind Differenzen von ca. 0,04 mg scharf zu trennen.

Wir haben mit diesen Methoden 1. reine Harnsäure-Lösungen untersucht, 2. menschliches Serum, 3. Organextrakte verschiedener Tiere.

Während sich bei den reinen Harnsäurelösungen nur die oben genannten Fehler zeigten, die sich gelegentlich auf 5—10% beliefen, oft niedriger waren, zeigten sich schon beim Serum zwei, auch von *Harpuder* und *Mond* genannte Fehlerquellen mehr.

Die erste betrifft nur die erste Methode von *Folin*. Es fragt sich, ob die Harnsäure durch Silberlactat quantitativ gefällt werden kann und andererseits, ob die die Blaufärbung verursachende Substanz überhaupt ausschließlich oder im wesentlichen Harnsäure ist. Nach den Untersuchungen von *Schreiner* besteht kein Zweifel, daß dies nicht der Fall ist. Der Vergleich der direkten und indirekten *Folin*-Methode ergab für die erste nur 50—85% der Werte der zweiten, auch wenn die von *Rogers* geforderte Vorsichtsmaßregel des absoluten Lichtschutzes strikte eingehalten wurde. Im gleichen menschlichen Serum fanden wir mit den beiden Methoden Werte, die von 1,9—4,7 mg% Harnsäure schwankten.

Die zweite, unserer Ansicht nach wichtigste Fehlerquelle betrifft die Enteiweißung. Auf sie wird bei den Organextrakten ausführlich eingegangen werden.

Die *Faltowsche* Methode, die darauf beruht, daß schon in der Kälte Harnsäure durch Ferricyankalium zu Allantoin oxydiert wird, und zwar angeblich spezifisch und in stöchiometrisch definiertem Verhältnis, gibt wohl in reinen Harnsäurelösungen ausgezeichnete Resultate und ist sogar einfacher als die kolorimetrischen Methoden. Da jedoch auch bei dieser

Methode vor der Bestimmung der Harnsäure im Serum resp. Organextrakten enteiweißt werden muß, sind die dabei unterlaufenden Fehler auch nicht ausgeschaltet. Im menschlichen Serum erhielten wir beim Vergleich der *Flatowschen* und der *Neubauerschen* Methode für die erstere stets niedrigere Werte und zwar um 10—20%. Zur Bestimmung der Harnsäure in Organen verwendete ich einerseits Organextrakte (Leber und Niere von Ratten und Katzen), andererseits Gewebeschnitte (Tauben und Hähne), wobei wir die Versuchsanordnung von *W. Schuler* und *Reindel* (1) benutzten. Ich untersuchte den Gehalt dieser Organe an Harnsäure und die Bildung von Harnsäure (Vögel) und andererseits machte ich Zusatzversuche. Enteiweißt wurde mit 10% Natriumwolframat + $^2/_3$ n-Schwefelsäure, 30% Trichloressigsäure gesättigter Uranylacetatlösung in Essigsäure, und 3% Salzsäure + 2% Quecksilberchlorid nach *Schenk*, wobei öfters sämtliche Enteiweißungsmethoden parallel an einem Organextrakt angewendet und alle Filtrate mit verschiedenen Harnsäurebestimmungsmethoden untersucht wurden. Als einziges Beispiel zahlreicher solcher Versuche führe ich an:

	Enteiweißung	Methode	mg Harnsäure in 100 ccm
Rattennierenextrakt	Trichloressigsäure	*Neubauer*	1
verdünnt 1:20	Uranylacetat	*Neubauer*	1,5
„	Trichloressigsäure	*Folin*	0,6
„	Uranylacetat	*Folin*	0,5
Extrakt + 1,75 mg	Trichloressigsäure	*Neubauer*	3 +14%
Harnsäure in 100 ccm	Uranylacetat	*Neubauer*	2,8—28%
„	Trichloressigsäure	*Folin*	1,6—43%
„	Uranylacetat	*Folin*	1,2—60%

Bei der Untersuchung der Harnsäurebildung durch Vogelorgane ließ sich zugesetzte Harnsäure durchschnittlich nur zu 40% wiederfinden, sodaß also auch die gefundenen Werte ohne Zusatz anzuzweifeln waren.

Was die verschiedenen Enteiweißungsarten anbelangt, ließ sich feststellen, daß sich Uranylacetat wenig zur Enteiweißung eignet, da der kleinste Ueberschuß davon eine, beim Kolorimetrieren störende Eigenfarbe der Lösung verursacht. Bei der Enteiweißung mit Natriumwolframat trat häufig schon vor Zusatz des Harnsäurereagens eine deutliche Blaufärbung auf. Die unberechenbarsten Resultate erhielten wir bei der Eiweißfällung nach *Schenk*. Die Enteiweißung mit Trichloressigsäure schien uns die regelmäßigsten Werte zu liefern, jedoch war auch bei ihrer Anwendung an eine quantitative Harnsäurebestimmung nicht zu denken. Außerdem war häufig eine leichte kolloidale Trübung (Glykogen), die den kolorimetrischen Vergleich verunmöglichte, schwer zu vermeiden. Sicher wird bei jeder Art der Enteiweißung ein Teil der Harnsäure und eben ein nicht immer gleich großer Teil vom Eiweißkoagulat mitgerissen und der Analyse entzogen.

Auf Grund meiner zahlreichen Versuche bin ich der Ansicht, daß auch die neueren Variationen der kolorimetrischen Harnsäure-Bestimmungsmethoden außerordentlich unzuverlässige Resultate geben, daß häufig nur ein kleiner Bruchteil, dann wieder das Mehrfache der tatsächlich vorhandenen Harnsäure bestimmt wird. Dies beruht wohl im Wesentlichen auf folgenden fünf Tatsachen:

1. Ein mehr oder weniger großer Teil der Harnsäure wird bei der Enteiweißung an den Niederschlag absorbiert (was *Harpuder* und *Mond* bewiesen haben) und zwar in absolut unberechenbarem Ausmaße.

2. Aus der enteiweißten Flüssigkeit läßt sich die Harnsäure niemals quantitativ fällen, während dies bei reinen Harnsäurelösungen annähernd gelingt.

3. Bei der direkten Bestimmung im enteiweißten Extrakt besteht nicht die geringste Gewähr dafür, daß wirklich Harnsäure und nicht eine der zahlreichen anderen, im Serum oder in den Organextrakten vorhandenen reduzierenden Substanzen bestimmt wird.

4. Die kolorimetrische Harnsäurebestimmung an sich gibt wegen der übergroßen Empfindlichkeit und wegen der Inkostanz der Reagentien sehr schwankende Werte, und da ja außerordentlich kleine Harnsäuremengen bestimmt werden sollen, ist der rechnerische Fehler sehr groß.

5. Die titrimetrische Harnsäurebestimmung nach *Flatow* leidet prinzipiell unter denselben Fehlern wie die kolorimetrische Methode dem Enteiweißungsfehler, der Unspezifität und der Inkonstanz der Reagentien.

Anders verhält es sich mit der oben genannten Methode von *Edson* und *Krebs* (14). Sie vermeidet die Enteiweißung und bestimmt die Harnsäure durch manometrische Messung des bei ihrem oxydativen Abbau auf dem Umweg über Allantoin entstehenden Harnstoffs.

Die Methode ist natürlich wesentlich komplizierter als die bisher gebräuchlichen, scheint uns aber die einzige zu sein, die verläßliche Resultate liefert. Bei Beherrschung der Methodik und genauestem Einhalten der von *Krebs* angegebenen Bedingungen, sind Werte von $90 \pm 5\%$ der tatsächlich vorhandenen Harnsäure zu finden, was durch zahlreiche Zusatzversuche gezeigt werden konnte.

Ich komme daher zum Schluß, daß sich die allgemein angewendeten kolorimetrischen Harnsäure-Bestimmungsmethoden sowie die titrimetrische Methode von *Flatow* nicht für physiologisch-chemische Arbeiten eignen, die Anspruch auf Genauigkeit erheben, und daß für diesen Zweck nur die prinzipiell neue Methode von *Edson* und *Krebs* einigermaßen zuverlässige Resultate verspricht.

1. *Schuler* und *Reindel:* Z. physiol. Chem. 1932, 221, 209. — 2. *Folin* und *Denis:* J. of biol. Chem. 1912, 12, 239 und 1912, 13, 14. — 3. *Benedict* und *Hitschoock:* J. of biol. Chem. 1915, 20, 629. — 4. *Folin:* J. of biol.

Chem. 1922, 54, 153. — 5. *Benedict:* J. of biol. Chem. 1922, 54, 233. — 6. *Neubauer:* Taschenbuch d. med. klin. Diagn. v. *Müller-Seifert* 1935, 34. Aufl., S. 125. — 7. *Harpuder* und *Mond:* Z. exper. Med. 1922, 27, 54. — 8. *Steudel* und *Suzuki:* Z. physiol. Chem. 1922, 119, 166. — 9. *St. J. Prcylecki:* Biochem. Z. 1932, 244, 190. — 10. *Schreiner:* Biochem. Z. 1928, 205, 245. — 11. *Landmann:* Z. physiol. Chem. 1914, 92, 416. — 12. *Blankenstein, A.:* Biochem. Z. 1931, 238, 461. — 13. *Flatow:* Biochem. Z. 1926, 176, 178. — 14. *Edson* und *Krebs:* Biochemic. J. 1936, 30, 732. — 15. *Folin* und *Wu:* J. of biol. Chem. 1919, 38, 100.